

霊長類色覚視物質の赤外分光解析

(名工大院工¹・分子研²・京大霊長研³)

○片山耕大¹、古谷祐詞^{1,2}、今井啓雄³、神取秀樹¹

【序】動物は、桿体視細胞に存在する視物質ロドプシンによる薄明視と、錐体視細胞に存在する視物質による色覚という二種類の視覚を持つ^[1]。ヒトを含む霊長類は、吸収極大波長が30 nm異なる緑・赤感受性錐体視物質を遺伝子重複により生成した^[2]が、桿体視物質ロドプシン^[3]と異なり X 線結晶構造も解かれておらず、我々が緑と赤を識別するための構造情報は皆無である。我々は過去に、2000 羽以上のニワトリ網膜から緑・赤感受性視物質を調製し、赤外分光測定を報告した^[4]。しかしながら、天然の試料ではアミノ酸の変異が不可能であり、色を見分けるメカニズム解明のため研究を深めることは困難であった。

そこで我々は最近、サルの錐体視物質を培養細胞により発現し、低温赤外分光法を用いた構造解析を開始した。培養細胞から得られる錐体視物質の発現量はロドプシンと比較してわずかであるが、77 K における Batho 中間体との光可逆性を利用することで高精度のスペクトルを測定することが可能となる。重水水和した光誘起差スペクトルの X-H, X-D 伸縮振動領域からは、レチナール近傍の水素結合ネットワークに関する情報を得ることもできる。本発表では、サル緑・赤感受性視物質に対して中赤外の全波数領域で初めて測定に成功したスペクトルを報告し、ロドプシンとは大きく異なっていた赤外スペクトルをもとに、色識別の分子メカニズムなどについて議論したい。

【実験】HEK293 細胞株により、サル緑・赤感受性視物質を発現し、界面活性剤による可溶化、抗体カラムによる精製の後、PC リポソームへ再構成した。この試料を BaF₂ 製赤外窓板上に滴下し、アスピレータにより乾燥させることでフィルムを作製した^[5]。D₂O で水和後、77 K での batho 中間体と基底状態との低温赤外差スペクトルを測定した^[4,5]。

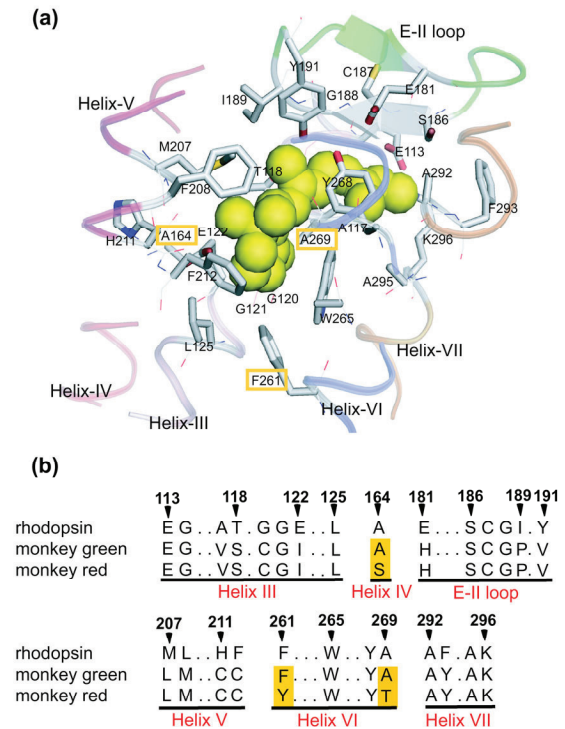


図 1 (a) ウシロドプシンにおけるレチナール発色団結合部位の X 線結晶構造 11-cis レチナール (黄色) から 5 Å 以内に存在する 27 アミノ酸の側鎖をスティック表示するとともに、近傍の二次構造をリボン表示した。(b) ロドプシン (ウシ&サル)、サル緑、サル赤感受性視物質におけるアミノ酸配列の比較 11-cis レチナールから 5 Å 以内に存在する 27 アミノ酸を表示。サル緑・赤感受性視物質の間で異なるアミノ酸は 3 個のみである。

【結果と考察】図2は、D₂O水和における77 Kで測定した光誘起FTIR差スペクトルを比較したものである。サルロドプシン、サル緑、サル赤の光反応において長波長シフトしたBatho中間体の形成は、それぞれ1561 (-)/1536 (+), 1534 (-)/1509 (+), 1527 (-)/1500 (+) cm⁻¹に現れた発色団レチナールのC=C伸縮振動の低波数シフトからも明らかである。サル緑とサル赤のスペクトルはよく似ているが(図2(a))、同時にサルロドプシンとも類似している(図2(b))。これ

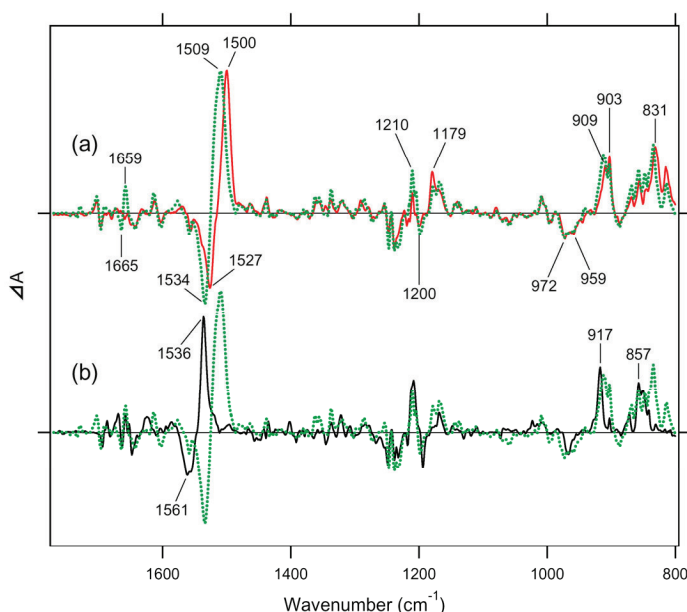


図2 1770-800 cm⁻¹領域におけるサル緑(緑点線)、サル赤(赤実線)、サルロドプシン(黒実線)の光誘起赤外差スペクトル。いずれもD₂Oで水和した試料に対する77 Kでの測定。

は1570-1500 cm⁻¹領域におけるC=C伸縮、1250-1150 cm⁻¹領域におけるC-C伸縮、そして1000-800 cm⁻¹領域におけるHOOP伸縮といった発色団レチナールの振動シグナルが、図2において大きく現れているからであり、11シス型から全トランス型への異性化反応に伴うレチナールの構造変化は、桿体視物質と錐体視物質とで共通であると解釈される。一方、amide-I領域でサル緑に観測された1665 (-)/1659 (+) cm⁻¹のバンドは、サル赤では観測されず、

サル緑でのみα_{II}-ヘリックスの構造変化が起こることがわかった。

図2によれば、ロドプシンと錐体視物質の赤外差スペクトルは類似していたが、今回、新たに得られた高波数領域のスペクトルには顕著な違いが観測された。

特に、水分子を含む水素結合ネットワークに関する情報を含むX-D伸縮振動領域では、サルロドプシンと錐体視物質の間ではスペクトルが大きく異なっていたのに対し、サル緑とサル赤では類似していた。サル緑とサル赤にはいずれもクロライドが結合することが知られているが、水分子を含む水素結合ネットワークは共通であることがわかった。一方、重水素と置換しないX-H伸縮振動領域にはサル赤に特異的なバンドが確認され、サル緑とサル赤で異なるアミノ酸(図1)に由来する可能性が示唆された。

以上の結果をもとに、緑色や赤色の光を受容する錐体視物質に特異的な発色団-タンパク質間相互作用について議論したい。

- [1] Y. Shichida, H. Imai, *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, 54, 1299-1315.
- [2] D. D. Oprian, A. B. Asenjo, N. Lee, S. L. Pelletier, *Biochemistry* **1991**, 30, 11367-11372.
- [3] K. Palczewski, T. Kumasaka, T. Hori, C. A. Behnke, H. Motoshima, B. A. Fox, I. Le Trong, D. C. Teller, T. Okada, R. E. Stenkamp, M. Yamamoto, M. Miyano, *Science* **2000**, 289, 739-745.
- [4] T. Hirano, H. Imai, H. Kandori, Y. Shichida, *Biochemistry* **2001**, 40, 1385-1392.
- [5] Y. Furutani, Y. Shichida, H. Kandori, *Biochemistry*. **2003**, 42, 9619-9625.